

光技術と微細加工技術の融合による 生体分子反応ダイナミクス解析

永井 萌 土^{*1}中曾根 祐 介^{*2}

Novel Analysis of Biomolecular Reactions by Optical Technologies and Microfabrication

Moeto NAGAI^{*1} and Yusuke NAKASONE^{*2}

To understand the molecular mechanisms of biological functions, analyzing reactions of biomolecules is essential. Transient grating (TG) spectroscopy is a unique technique that enables the time-resolved detection of molecular reactions. However, the conventional TG method had limitations in two aspects: one was its restriction to detecting reaction systems driven by light, and another was its low spatial resolution, which prevented observation of reactions in confined spaces such as within cells. Therefore, in this study, we aimed to establish two novel techniques: the liquid-feeding TG method (which operates without light excitation) and the microscopic TG method (which enhances spatial resolution). These were developed through the integration of optical and microfabrication technologies to introduce innovative analytical methods for biological molecule reactions. The liquid-feeding TG method creates a grating using devices containing pneumatic valves or slip chips, and the reaction induced by the mixing of two solutions can be observed in the time domain. The microscopic TG method improves the spatial resolution of TG by employing objective lenses to analyze reactions of biological molecules within minute spaces like cells. This collaborative research has successfully developed essential technologies for these devices. We will further improve the measurement systems to evolve them into highly adaptable and versatile techniques.

1. 背景と目的

生命機能は生体分子に担われ、その本質は細胞内外での化学反応の連鎖である。機能発現時には、分子内の局所反応・高次構造変化・分子間反応という多段階で過渡的な反応を起こすため、生体分子の動作原理の理解には、時間分解での反応解析が必要不可欠である。そのために、吸収や蛍光をベースとした測定法が多用されるが、その多くが局所的な情報を与えるのみで、分子の外形が変わるような大きな構造変化や、分子間の情報伝達の全貌を捉えきれない。そこで中曾根らは生体分子の高次構造に敏感な拡散係数に着目し、過渡回折格子 (Transient Grating: TG) 法により、その時間変化を検出することで、様々な生体分子の反応解析を推進してきた^{1,2}。時間分解での拡散解析は世界で唯一無二であり、他の手法では観測が困難な分子内・分子間反応を高感度に検出できる (図 1)。TG 法では、二本の励起パルス光で形成した光の干渉縞によって分子を励起し、反応に伴う屈折率変化をプローブ光の回折光として観測する (図 1a)。回折格子は分子の拡散によって解消するため、回折光強度の減衰速度から拡散係数を決定できる。格子間隔が $1\ \mu\text{m}$ 程度と短いため、短時間 ($\sim 100\ \mu\text{s}$) で拡散係数を決定でき、その時間変化から高次構造変化や会合・解離反応を検出することが可能である (図 1b)。

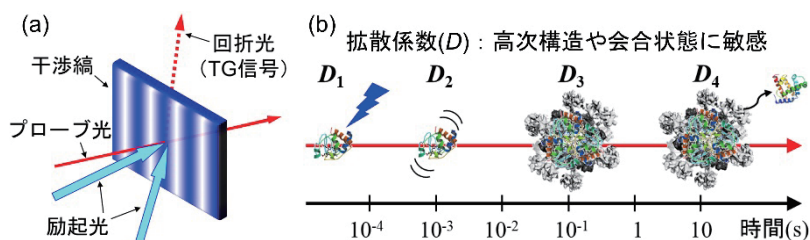


図 1 (a) TG 法の原理図, (b) 拡散係数変化で捉えるタンパク質反応。

2024年3月3日 受理

^{*1} 豊橋技術科学大学次世代半導体・センサ科学研究所

^{*2} 京都大学大学院理学研究科化学専攻

しかし、TG 法はその原理上、光で反応を駆動できる系にのみ適用可能であったため、測定対象は光センサタンパク質に限られていた。また、従来の TG 法は、バルク溶液中での反応解析に最適化されていたため、空間分解能はゼロに等しく、細胞のような微小空間で起こる生体分子反応の観測には適用できなかった。そこで本研究では、中曽根が有する光技術と永井が有する微細加工技術の有機的連携により TG 法を発展させ、「① 簡便で精度が高く、光励起を必要としない反応解析法」、「② 高い時空間分解能を有する反応解析法」という二つの革新的技術を創出することを目的とした(図 2)。

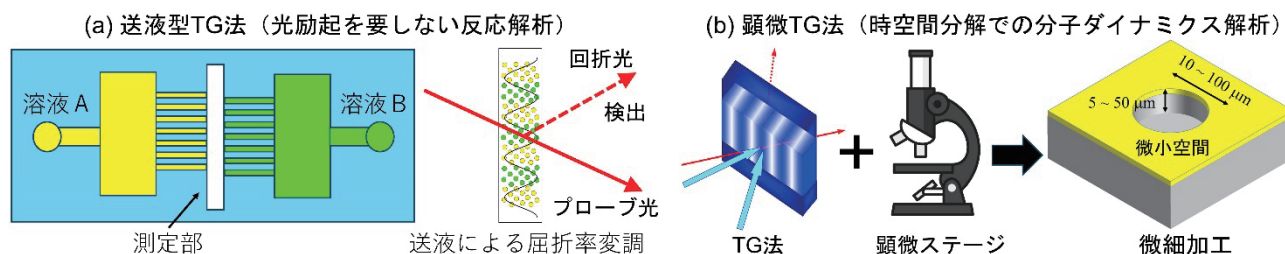


図 2 本研究の概念図。(a) 格子状の微細加工を用いた TG 解析、(b) TG 法の顕微化と微小空間内での反応解析。

2. 送液 TG 法の開発

多様な微細加工技術を駆使することで、光ではなく物理的に格子状の屈折率変調を生成し、これをプローブ光の回折として捉える新手法を開発する(送液 TG 法の開発)。そのために二つの方式で微細加工を行った。1 つ目は空圧バルブ式、2 つ目はスリップチップ式である。以下にそれぞれについての研究内容を報告する。

空圧バルブ式では、組成が異なる二種類の溶液を格子状のスリットから測定部に互い違いに送液することで縞状の濃度勾配を形成し(図 3a)、これに伴う屈折率変調(回折格子)をプローブ光の回折光として検出する。空圧バルブは 10 μm の厚さのシリコンゴム(PDMS)の薄膜を主材料としている。このバルブに

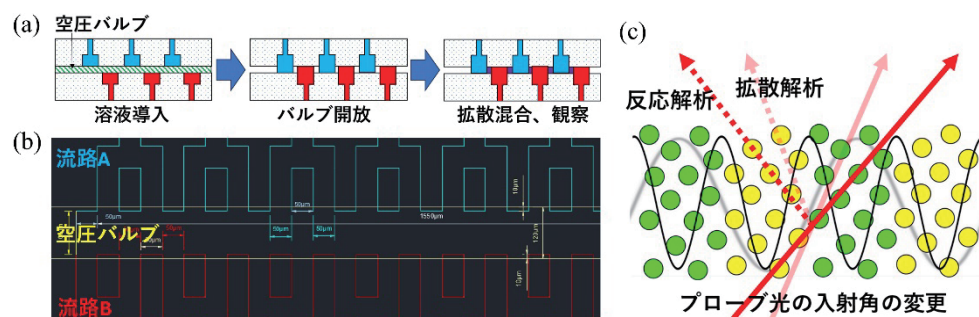


図 3 (a) 空圧バルブ式 TG 法の模式図、(b) 加工図面(流路幅 50 μm)、(c) 溶液中の屈折率変調の模式図(回折角の差を利用した拡散解析と反応解析)。

加圧した状態で、2 液をチャンバ内に充填する。大気圧にするとバルブが開放され、2 液が測定部に入り込み、回折格子が形成される。実際の加工は、図 3b に示す設計図に従って行った。多層 PDMS チップをガラス基板上に載せて、接合後、張り合わせた構造体を作製し、シリコン基板上に厚膜フォトリソ SU-8 を型として PDMS で型取りして作製した。これにより、送液停止後の回折光強度の時間変化から溶質分子の拡散過程を解析することが狙いである。また、二液の混合により化学反応が起こる場合、二液の接触面で新たな屈折率変化が生じる。その格子間隔は、二液の注入で形成する回折格子の格子間隔に比べて半分になるため、回折光が出てくる角度も両者で異なる(図 3c)。したがって、プローブ光の入射角を変えることで、反応による寄与と拡散による寄与を分離して解析できると考えた。しかし、溶液を充填してテスト測定を行った結果、空圧バルブに加圧しても液が徐々に漏れてしまうことがわかった。現在は、送液の精密な ON・OFF を達成するために、上層の空圧バルブの幅を広げるといった改良を加えている。

スリップチップ式では、格子状のウェル加工がなされた上下チップが物理的に分離されており、各チップに 2 液を充填した後にスライドさせて 2 液を接触させる(図 4a)。これにより拡散混合を引き起こし、駆動される化学反応を回折光強度の時間変化として検出する。そのための設計図を図 4b に示す。2 液の混合および観測に用いる格子状のウェルに加えて、液を充填するための流路を配置した。これを二つ用意し、加工面が合わさるように重ねることで、まず流路とウェルを接触させる。送液によってウェル内に溶液を充填したのち、チップをスライドし、ウェル同士を重ねることで二液の混合を開始することが狙いである。チップは、シリコン基板上に厚膜フォトリソ SU-8 3050 を型材料として、PDMS で型取りして作製した。そしてチップ同士の接触やスライドのための制御器を作製した(図 4c)。また、操作時にはチップ間にシリコンオイルを充填することで、潤滑を保ちつつ、蒸発を防ぐという工夫を施した。この装置を用いて実際に位

置合わせをした際の顕微画像を図4dに示す。ウェルが流路に重なった状態から、ウェル同士が重なった状態へと切り替えることができる。さらに、本加工物により回折光が得られるかをテストしたところ、図4eに示すようにレーザー光の透過光に加えて、きれいな回折パターンが得られた。回折角は作製したウェルの格子間隔から計算される回折角と一致しており、異なる波長のレーザーや様々な格子間隔の加工物を用いてのテスト測定に成功している。こうして反応解析の準備が整ったため、現在は実際に溶液を充填してのテスト測定を進めている。

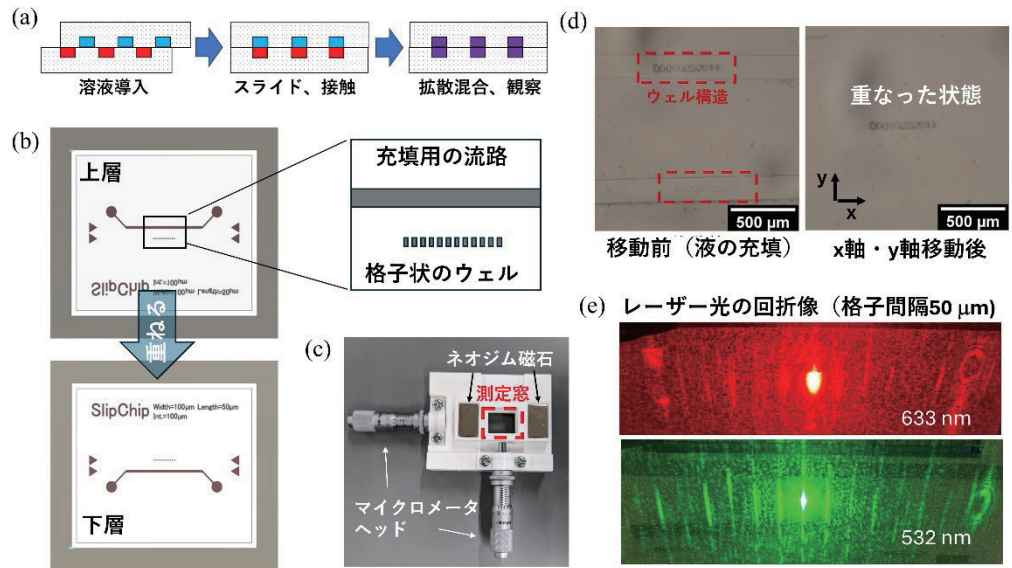


図4 (a) スリップチップ式TG法の模式図、(b) ウェル加工の模式図、(c) スリップチップの制御器、(d) 加工物の顕微画像、(e) レーザー光の回折像。

3. 顕微 TG 法の開発

生体分子が機能する細胞は直径 20 μm 程度の微小空間であり、内部には多種多様な分子が高濃度に混在している。そのため細胞内での生体分子の振る舞いは、希薄なバルク環境とは大きく異なると考えられている。これを実測するために、細胞サイズ程度の微小空間における反応解析法の開発に取り組んだ(図5a)。具体的には、TG法の空間分解能を高めるために、対物レンズや集光レンズを用いたTG法の開発を進め、これまでに水平方向 10 μm 、奥行き方向 30 μm という空間分解能を達成した(通常のTG法は 1 mm 程度)。しかし、テスト測定の結果、TG信号の

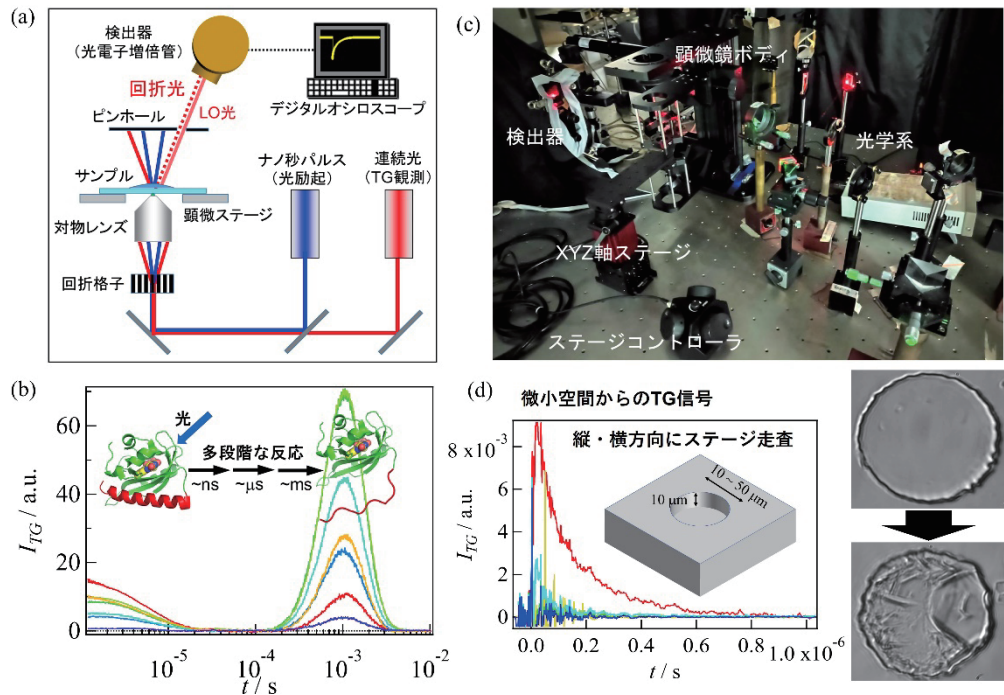


図5 (a) 顕微TG法の模式図、(b) 空間分解能を高めたTG法で得たフォトロピンのTG信号、(c) 顕微鏡セットアップの写真、(d) 微小空間からのTG信号と加工物の顕微画像(上: 溶液封入後1時間、下: 溶液封入後24時間、蒸発による塩の析出)。

強度が非常に弱く、タンパク質の反応解析が困難であることがわかった。当初は対物レンズで集光し、回折された光を光電子増倍管で検出していたが、検出器に届くまでに信号が発散してしまい、信号を大きくロスすることが考えられた。また、これを抑えるために検出器をサンプルに近づけると、散乱光や漏れ光が検出器に入ってしまう、強いノイズとなるこ

とがわかった。そこで、対物レンズをサンプルと検出器の間に追加し、発散する前に平行光に戻すという方式を取った。これにより光の発散が抑えられ、さらに信号光のみをピンホールに通すことでノイズを抑えることができた。その結果、当初より S/N 比を 100 倍近く向上することができた。本手法により、光センサータンパク質 phototropin の反応解析を行ったところ、図 5b に示す TG 信号を取得することができた。ミリ秒付近に観測された立ち上がりと減衰からなる山型の信号は、光励起によってタンパク質分子の拡散係数が変化することを示しており、これは光反応に伴うヘリックス構造の崩壊に起因する³。すなわち空間分解能を高めた TG 法によってもタンパク質の構造変化を高感度かつ高い時間分解能で検出できることがわかった。

続いて本手法を、設計の自由度が高い Thorlabs 社の自作顕微鏡システムに組み込むことで、空間走査しながら各点における反応解析が可能なシステムを立ち上げた (図 5c)。そして、微細加工により細胞サイズ程度の微小空間を作製し、そこにサンプルを滴下して、カバーガラスで密閉したものを測定に用いた。ステージ走査しながら測定した結果、レーザー光が微小空間に合わさるときにのみ TG 信号が得られることを確認した。これは微小空間内の反応を選択的に検出できることを示す結果である。しかし、微小空間に溶液を封入して長時間を置くと、徐々に溶液が蒸発してしまうことが新たにわかった (図 5d)。これは PDMS への水の浸透が原因と考えられるため、現在は浸透を抑えるためのガラスを付与する追加加工を進めている。また、将来的には本手法を細胞内での反応解析に適用することを見据えているため、その準備としてヒト細胞の培養にも着手した。

4. 今後の展望

本共同研究により光技術と微細加工技術の融合を行い、新たな装置開発に必要な技術要素の開発を進めることができた。送液 TG 法は、溶液混合により駆動可能な多岐に渡る生体分子反応 (シグナル伝達、フォールディング、遺伝子制御など) の解析を可能とする。薬剤による分子間相互作用の阻害・促進効果の解析にも役立つため、医学・薬学研究の発展にも貢献しうるほか、簡便な拡散係数測定装置としても活用できるため、微粒子の粒径評価や溶媒の粘度解析に適用するなど、応用性・発展性が高い基盤技術となると期待される。顕微 TG 法は、生体分子反応の時空間分解計測を可能とする。高次構造変化や分子間反応といった分子ダイナミクスを時空間分解で捉えることで、反応速度論に基づく生命現象の数理モデル解析を強力に推進するための基盤技術になると期待される。今後も改良を重ね、将来的には送液 TG 法のポータブル化・パッケージ化や、顕微 TG 法のシステム化を進め、応用性・汎用性の高い技術に昇華させていく予定である。

REFERENCES

- 1) M. Terazima, *Acc Chem Res.*, **54** (2021) 2238-2248.
- 2) Y. Nakasone and M. Terazima, *Photochem Photobiol Sci.*, **21** (2022) 493-507.
- 3) Y. Nakasone, M. Ohshima, K. Okajima, S. Tokutomi and M. Terazima, *J Phys Chem B.*, **123** (2019) 10939-10950.